

磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PEPCK) 活性检测试剂盒 (微量法)

产品货号: BA1193

产品规格: 100管/96样

产品简介:

PEPCK (EC 4.1.1.32) 广泛存在于动物、开花植物、藻类、部分真菌和细菌中。该酶催化草酰乙酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸,是调节糖异生途径的第一限速酶。

PEPCK 催化草酰乙酸生成磷酸烯醇式丙酮酸和 CO_2 , 丙酮酸激酶和乳酸脱氢酶进一步依次催化NADH氧化生成 NAD^+ , 在340nm下测定NADH下降速率, 即可反映PEPCK活性。

注意: 实验之前建议选择2-3个预期差异大的样本做预实验。如果样本吸光值不在测量范围内建议稀释或者增加样本量进行检测。

产品内容:

试剂名称	规格	保存条件
提取液	液体110mL×1瓶	2-8℃
试剂一	液体18mL×1瓶	2-8℃
试剂二	粉剂×1瓶	-20℃
试剂三	液体18 μL ×1支	2-8℃
试剂四	液体62 μL ×1支	2-8℃
试剂五	粉剂×1瓶	-20℃

溶液的配制:

1. 试剂二: 临用前加入15mL试剂一溶解。可溶解后分装-20℃保存, 避免反复冻融。
2. 试剂三: 液体置于试剂瓶内EP管内。临用前加入蒸馏水按体积比1: 120稀释, 现用现配。
3. 试剂四: 液体置于试剂瓶内EP管内。临用前加入蒸馏水按体积比7: 250稀释, 现用现配。
4. 试剂五: 粉剂置于试剂瓶内玻璃管内。临用前加入2.5mL蒸馏水充分溶解; 可溶解后分装-20℃保存, 避免反复冻融。
5. 工作液的配制: 将试剂二、试剂三、试剂四按 7:1:1 (V:V:V) 的比例配制工作液, 工作液现用现配。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计/酶标仪、低温离心机、水浴锅、微量石英比色皿/96孔UV板、可调式移液枪、研钵/匀浆器、冰和蒸馏水。

操作步骤:

一、样本处理 (可适当调整待测样本量, 具体比例可以参考文献) :

1. 组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积(mL)为 1: 5~10的比例 (建议称取约0.1g组织, 加入1mL提取液) 进行冰浴匀浆, 然后8000g, 4℃, 离心10min, 取上清, 置冰上待测。
2. 细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为500~1000: 1的比例 (建议500万细菌或细胞加入1mL提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率20%或200W, 超声3s, 间隔10s, 重复30次); 8000g 4℃离心10min, 取上清, 置冰上待测。
3. 血清 (浆) 样品: 直接检测。

二、测定步骤:

1. 紫外分光光度计/酶标仪预热30min以上, 调节波长至340nm, 蒸馏水调零。
2. 将工作液置于37℃(哺乳动物)或25℃(其它物种)预热5分钟。
3. 操作表: 在微量石英比色皿/96孔UV板中依次加入下列试剂:



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话: 400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q: 807961520 731791866

邮箱: zzlybio@126.com

试剂名称 (μL)	空白管	测定管
样本		10
蒸馏水	10	
工作液	180	180
试剂五	10	10

加入试剂五后立即混匀，于340nm处测定10s时的吸光值A1和1min10s时的吸光值A2，计算ΔA测定管=A1测定-A2测定，ΔA空白管=A1空白-A2空白，ΔA=ΔA测定管-ΔA空白管。空白管只需做一次。

三、PEPCK酶活计算：

1. 按微量石英比色皿计算：

(1) 按蛋白浓度计算

酶活定义：每mg组织蛋白每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PEPCK 酶活 (U/mg prot)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T \\ &= 3215.4 \times \Delta A \div C_{\text{pr}} \end{aligned}$$

(2) 按样本质量计算

酶活定义：每g组织每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PEPCK 酶活 (U/g 鲜重)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (V_{\text{样}} \times W \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 3215.4 \times \Delta A \div W \end{aligned}$$

(3) 按照细菌或细胞数量计算

酶活定义：每10⁴个细菌或细胞每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PEPCK 酶活 (U/10}^4\text{cell)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T \\ &= 6.43 \times \Delta A \end{aligned}$$

(4) 按照血清（浆）体积计算

酶活定义：每毫升血清（浆）每分钟消耗1nmol的NADH定义为一个酶活力单位。

$$\begin{aligned} \text{PEPCK (U/mL)} &= \Delta A \div (\epsilon \times d) \times 10^9 \times V_{\text{反总}} \div V_{\text{样}} \div T \\ &= 3215.4 \times \Delta A \end{aligned}$$

ε：NADH摩尔消光系数，6.22×10³L/mol/cm；d：比色皿光径，1cm；V反总：反应体系总体积，0.0002L；V样：反应体系中样本体积，0.01mL；V样总：加入提取液体积，1mL；Cpr：样本蛋白浓度，mg/mL，蛋白浓度自行测定；W：样本质量，g，T：反应时间：1min；500：细菌或细胞总数，500万；10⁹：单位换算系数，1mol=10⁹nmol。

2. 按96孔UV板计算：

将上述公式中的d-1cm改为d-0.6cm（96孔板光径）进行计算即可。

注意事项：

1. 当A1小于1或ΔA小于0.6时（96孔UV板是当A1小于0.6或ΔA小于0.4时），建议将样品稀释适当倍数后再进行检测，以提高检测灵敏度。
2. 酶活性高的样品如动物肝、肾等组织，建议将提取液稀释5倍或5倍以上测定。
3. 空白管为检测各试剂组分质量的检测孔，正常情况下，变化不超过0.06。
4. 加样、混匀等步骤要迅速，秒表计时要准确。



扫一扫 加微信

郑州乐业生物科技有限公司

Zhengzhou Leye-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：郑州市高新区红松路36号龙鼎企业中心一期1号楼5楼25号

免费电话：400-611-0007 13671551480 13643719799

Q Q：807961520 731791866

邮箱：zzlybio@126.com